

TIP VE ADLİ BİLİMLERDE RAMAN UYGULAMALARI

RAMAN APPLICATIONS IN MEDICINE AND FORENSIC SCIENCE

Cem ZEREN¹, Güneş AÇIKGÖZ², Berna HAMAMCI²

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adli Tıp Bölümü, Hatay

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay Sağlık Hizmetleri MYO, Hatay

ÖZ

Raman Spektroskopisi (RS) genellikle lazer kaynağın-
dan çıkan monokromatik ışının inelastik saçılmasına
dayalı bir tekniktir. RS, hiçbir numune hazırlamayı ge-
rektirmeyen, çok az bir numunenin bile ölçüm için yer-
terli olduğu ve numuneye zarar vermeyen bir yöntem-
dir. RS çeşitli tıp uygulamalarında etkili ve çok yönlü
analitik teknik olduğu kanıtlanmıştır. Biyolojik sıvılarda,
organik ve inorganik bileşiklerin varlığının tespitinde
kullanılmaktadır. Ayrıca insan ait dokularının kimyasal
bileşimlerinde, kan metabolitlerinin ve tedavi edici
ilaçların kimyasal ölçümlerinde, klinik tanı ve biyolojik
örneklerin kantitatif analizi için ve daha birçok çalışmada
kullanılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Raman spektroskopisi, SERS,
Tıp Bilimleri, Adli Bilimler, İnelastik saçılma

GİRİŞ

Spektroskopi, moleküllerin titreşimini tespit etmek için
Raman saçılması ve kızılötesi absorpsiyon süreçlerine
dayalı olarak çalışır. Raman Spektroskopisi (RS) monok-
romatik lazer ışınlarının moleküllerle etkileşimi boyunca
meydana gelen inelastik saçılmaya bağlı titreşimsel
spektroskopidir. Raman spektroskopisinde kullanılan
dalga boyu ile incelenen örnekten elde edilen absorpsiyon
demetinin dalga boyu birbirinden farklıdır (1). Farklı
frekanslarda saçılan ışınların fotonları Raman
spektrumunun yapısını oluşturarak moleküler yapının
karakteristiğinin belirlenmesini sağlar (2,3).

RS Adli tıp, biyoloji, malzeme bilimi ve daha birçok alanda
kullanılan çok duyarlı bir tekniktir, mikroskopik örnekler
üzerinde hızlı, duyarlı, tahribatsız analiz sağlar. Ayrıca RS
ile yapılan çalışmalarda, incelenen numune hakkında kısa
sürede analitik veriler elde edilebildiğinden dolayı son
yıllarda dünya genelinde önemi gittikçe artmaktadır (4-6).

Bu makale 4-6 Haziran 2015 Isparta'da düzenlenen 12.
Adli Bilimler Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

Makale Geliş Tarihi : 17.11.2014
Makale Kabul Tarihi: 08.07.2015

ABSTRACT

Raman Spectroscopy (RS) is a technique based on inelastic
scattering of monochromatic beam from the laser
source. RS is a method which requires no sample preparation,
only a small sample is sufficient for measurements and do not
damage the sample. RS has proven to be a versatile and effective
analytical technique in a variety of forensic applications. RS is
used to determine biological fluids and the presence of organic
and inorganic compounds. In addition, RS is used to determine
the chemical compositions of human tissue, for blood metabolites
and therapeutic drugs for chemical measurements, for clinical
diagnosis and quantitative analysis of biological samples and in
many studies.

Keywords: Raman spectroscopy, SERS, Medical Sciences,
Forensic Science, Inelastic scattering

Su zayıf Raman saçıcıdır ve birçok titreşimsel spektroskopide
sulu çözeltileri incelemek güçtür. Fakat Raman spektroskopisi
teknikinde sulu çözeltilerin Raman spektrumu su titreşimleri
olmadan da elde edilebilir. Bu nedenle RS sulu çözeltilerdeki
biyolojik bileşenlerin incelenmesi ve belirlenmesi bakımından
idealdir ve FTIR ve Infrared spektroskopisine göre daha üstün
bir yöntem olduğu belirtilmiştir (7).

Raman spektroskopinin çalışma prensibi

Işının inelastik saçılması ilk kez Smekal tarafından 1923
yılında teorik olarak belirtilmiştir. Daha sonra Raman ve
Krishnan bu olguyu deneysel olarak 1928 yılında gözlemlemişler
ve Nature'da rapor etmişlerdir. Ayrıca, fotonların inelastik
saçılmasına Raman saçılımı denir. Genel olarak ışın maddeyle
etkileştiği zaman elektromanyetik spektrumdaki kızılötesi ve
ultraviyole kısmındaki belli bir dalga boyuna sahip fotonlar
kolayca absorbe edilirler veya saçılırlar (7-11).

Corresponding Author: Berna HAMAMCI,
Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay Sağlık Hizmetleri MYO,
Bağrıyanık Mah. Hastane Cad. No:44 Antakya/HATAY,
E-Posta: uzmberna@hotmail.com

Işın bir ortamdan geçtiği zaman gelen ışın demetinin bir kısmı farklı yönlerde saçılır. Bu nedenle bir maddenin Raman spektrumunda üç tür pik görülür. Bunlar; Rayleigh ışını piki, Stokes ışını piki, anti-Stokes ışını piki olarak sınıflandırılır. Işın saçıldığında birçok foton elastik olarak saçılır ve bu elastik saçılmaya Rayleigh saçılması denir. Fotonları çok az bir kısmı ise Raman saçılmasına uğrar. Saçılma frekansı başlangıç frekansından daha küçük ise Stokes Raman piki, daha büyük ise anti-Stokes Raman piki oluşur (11).

Tipik Raman analiz sistemleri dört temel bileşenden oluşur:

1. Uyarma kaynağı (Lazer)
2. Numune aydınlatma ve toplama sistemi
3. Dalga boyu seçicileri (spektrofotometre veya filtre)
4. Algılama ve bilgisayar kontrol sistemi.

Uyarma kaynağı olarak lazer kullanılır çünkü monokromatik lazer ışın koherent ışın oluşturabilir. Lazer kaynağı gerekli Raman sinyalinin oluşturması için yeterince güçlü olmalıdır (12).

Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Nedir?

RS analitik kimya ve biyokimya için mükemmel teknik gibi görünse bile başlıca dezavantajı düşük tesir kesitli saçılmadır ve bu saçılma floresan veya elastik saçılan ışın tarafından engellenebilen zayıf sinyalle sonuçlanır. RS'nin bu dezavantajı SERS (Surface-enhanced Raman Scattering) ile ortadan kalkar (13). İlk kez Fleischmann ve ark. SERS tekniğinin katı metal yüzey üzerinde Raman sinyallerini arttırabileceğini fark etmişlerdir (14). SERS artan elektrik alanla birlikte metal yüzeyde yüksek Raman saçılım yoğunluğuna neden olabilen plazmonik bir etkidir. Normal RS ile karşılaştırıldığı zaman SERS nano yapıları metal parçacıkların varlığını gerektirir (6,15).

Metalik nano yapıları metal parçacık yüzeyindeki plazmon rezonansı önemli ölçüde lokal yüzey artışına neden olur ve bu sayede Raman saçılımı sinyalleri önemli ölçüde artar (16,17). SERS de hem altın hem de gümüş nanopartikül yakınında yerleşmiş moleküllerin Raman saçılımını 10^5 - 10^8 katı kadar arttırır (18).

SERS etkisini açıklamaya çalışan iki tane teori bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, gelen radyasyon ile lokal elektrik alanının artmasına neden olan plazmonlar arasındaki etkileşimini açıklayan elektromanyetik teoridir. İkincisi ise, metalik yüzey ile molekül arasında şekillenen yük transfer teorisindeki bağıdır. Yani SERS etkisi elektromanyetik ve kimyasal artışın bir kombinasyonu olarak bilinmektedir (19,20).

SERS'i destekleyen birçok yapı (pürüzlendirilmiş metal elektrotlar, metal nanoparçacık kolloidleri, metal filmler gibi) bulunmuştur. Ayrıca SERS için çeşitli numune hazırlama teknikleri kullanılır. SERS kolloidal metal nanopartiküller (gümüş, altın ve bakır) yüzeyine veya bu metaller kullanılarak oluşturulan ince film yüzeylerine absorblanmış örneklerin, Raman spektrumlarını elde etmeye dayanır. Altın nanopartiküller sitrat sentezinin elde edilmesi ve kullanılması (21) Raman saçılmasının zenginleşmesini sağlar. Bundan dolayı substrat yüzey oldukça önemli hale gelmektedir (22,23).

RAMAN SPEKTROPİSİ UYGULAMALARI

RS inorganik, organik ve biyolojik sistemlerin kalitatif

ve kantitatif analizlerinde kullanılmaktadır (24).

Adli Bilimler'de;

RS çeşitli adli uygulamalarda etkili ve çok yönlü analitik teknik olduğu kanıtlanmıştır. Raman saçılımının invaziv olmayışı, mikroskop ile cihazın bir arada ve numunenin çok az miktarının bile inceleme için yeterli olması gibi avantajlarının olması adli bilimlerde kullanılması bakımından önemlidir (10,25).

Adli tıpta yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. RS hızlı ve basit bir yöntem olduğu için alkollü içeceklerin belirlenmesinde, banknotların üzerinde, tırnaklarda, kıyafetlerde, parmak izinde, içeceklerde uyuşturucu tespit edilmesinde kullanılmaktadır (5,26).

Ali ve ark. (27) doğal sentetik üzerinde Kokain Hidroklorür ve N-methyl-3,4-methylenedioxy amphetamine (MDMA) eser miktarlarını, yaptıkları başka bir çalışmada (28) ise kıyafetler üzerindeki patlayıcı madde parçacıklarını incelemek için konfokal Raman mikroskopunu kullanmışlardır. Massonnet ve ark. (29) pamuk elyafının üstündeki reaktif boyaların belirlenmesinde, Heudt ve ark. (30) siyah ve renkli mürekkep püskürtmeli basılı belgelerin incelenmesinde, Sikirzhyskaya ve ark. (31) vajinal sıvı incelenmesinde RS kullanmışlardır.

Farmakoloji'de;

Olds ve ark. (32) plastik kabarcıklı paketin içine bir antibiyotik kapsül tanımlanması; bir toz ihtiva eden bir zarf analizi ve şeffaf olmayan plastik şişe içinde ihtiva edilmekte olan temiz bir çözücü içinde çözülmüş bir ilacın belirlenmesi gibi ambalajlı veya kapalı paketlerin analizini yapmışlardır. Elshout ve ark. (33) çeşitli oküler ilaçlara ait Raman spektrumları elde etmişler ve bazı ilaçlardaki farklı pikleri göstermişlerdir.

Bakterilerin incelenmesinde;

RS bakterilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakterilerin tür, cins ve suşlarının geniş bir yelpazede doğru sınıflandırılmasında, hızlı tanımlanmasında ve biyokimyasal karakterizasyonlarının belirlenmesi için son zamanda daha dikkat çekici bir duruma gelmiştir. Çeşitli çalışmalara bakıldığında Raman cihazında farklı teknikler kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalar; bakteri hücre duvarının karakterizasyonunda, SERS ile bakterilerin tanımlanmasında ve suş seviyesinde mikroorganizmalar arasındaki ayrımın yapılmasında kullanıldığı belirtilmektedir. Ayrıca SERS tekniği ile farklı bakteri türleri de incelenmiştir (34).

Lahr ve Vikesland (35) algleri incelemek için altın nanoparçacık, Cui ve ark.(36) değişik biyolojik sistemlerin toksik etkisini incelemek için gümüş nanoparçacık sentezleyerek SERS kullanmıştır.

Parazitoloji;

Parazitoloji alanındaki çalışmalar incelendiğinde bazı parazitler üzerinde yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Plasmodium enfeksiyonu olan farelerde, sıtma hastalığının ilerlemesinden sonra eritrosit ve plazma içindeki değişikliklerin incelenmesinde RS'nin kullanıldığı bildirilmektedir. Plasmodium enfeksiyonu mevcut yöntemlerle bir gün sonra tespiti zor olmasına rağmen, RS ile bir gün sonra bile güvenilir sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir (37).

Optik spektroskopisi olan bu yöntem, insan dokusunun

kimyasal bileşimlerinde, kan metabolitleri ve tedavi edici ilaçların kimyasal ölçümlerinde, klinik tanı ve biyolojik örneklerin kantitatif analizi için ve daha birçok çalışmada kullanılmaktadır. Toxoplasmosis hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı açısından önemli bir zoonotik hastalıktır. Bu hastalığın tanısında yüksek maliyetli ve zaman alıcı değişik serolojik teknikler kullanılmaktadır. Bu nedenle RS tekniklerinden birini kullanarak *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun tanısı için yeni bir yöntem olarak kullanılmıştır. 23'ü serolojik yöntemlerle pozitif olduğu bilinen ve 1'i negatif negatif referans olarak kabul edilen toplam 24 kedi serumu RS ile analiz edilmiş ve bu incelemenin antikor ölümünde kullanışlı ve yararlı olduğu bildirilmiştir (38).

Acanthamoeba (AC) keratiti genellikle kontak lens kullananlarda nadir görülen ve hızlı tedavi gerektiren bir kornea hastalığıdır. Bu nedenle RS kullanılarak yapılan bir çalışmada ölü veya canlı ayrımı olmadan tek bir (AC) hücrenin tanımlanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir. AC tanı ve tedavisinin izlenmesinde sıklıkla kullanılan moleküler yöntemlere nazaran önemli bir gelişme gösterdiğini bildirmişlerdir (39). Ayrıca RS'nin periodontitis teşhisi için perspektif bir yöntem olarak da kullanılabilirliğini bildirilmiştir (40).

Kanser Araştırmalarında;

Raman spektroskopisi in vivo doku tanısı için hızlı ve pratik bir araç haline gelmiştir (41). Melanom dışı cilt kanseri (Non-melanoma Skin Cancer (NMSC) vakalarının sayısı yaşanan nüfus büyüdükçe artmaya devam etmektedir. Bu nedenle NMSC'nin teşhisi için diyagnostik prosedürle kombine edilmiş Raman spektroskopisinin hızlı ve etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (42). Cao ve ark. (43) ise idrarda kanser belirteci olan Asetilamantadin'i Raman spektroskopisiyle tespit etmişlerdir. Li ve ark. (44) sağlıklı gönüllülerin ve mesane kanserli hastaların serum SERS spektrumlarını ölçmüşler ve elde ettikleri verileri uygun istatistikle değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, iki incelemenin de birbirinden farklı olduğu görülmektedir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

RS mikroskobik örnekler üzerinde hızlı, duyarlı, tahriatsız analiz sağladığından ve analitik veriler elde edilebildiğinden dolayı son yıllarda dünya çapında önemi gittikçe artmaktadır. Ayrıca RS'nin özellikle Tıp ve Adli Bilimlerde daha fazla önem kazanacağına inanmaktayız. Literatüre baktığımızda, RS ile çok farklı çalışmalar yapılmış ve güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle tıpta tanı ve teşhis amaçlı uygulanan farklı yöntemler ve cihazlar mevcuttur. Fakat birçok yöntem sonuç elde etme bakımından uzun zaman gerektirmekte veya birkaç gün bekleyen numunelerden de güvenilir sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle, RS gibi duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek bir cihazla veriler elde etmenin ve eğer gerekiyorsa SERS gibi tekniklerin de uygulanmasının birçok avantajı (zaman ve güvenilirlik gibi) olacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Sikirzhyski V, Sikirzhyskaya A, Lednev IK. Multi-dimensional Raman spectroscopic signatures as a tool for forensic identification of body fluid traces: A review. *Applied spectroscopy*. 2011; 65: ss.1223-1232.
2. Braz A, Lopez-Lopez M, Garcı'a-Ruiz C. Raman spectroscopy for forensic analysis of inks in questioned documents. *Forensic Science International* 2013; 232: 206-212.
3. Izake EL. Forensic and homeland security applications of modern portable Raman spectroscopy. *Forensic Science International* 2010; 202: 1-8.
4. Boyd S, Bertino MF, Seashols SJ. Raman spectroscopy of blood samples for forensic applications. *Forensic Science International* 2011; 208: 124-128.
5. Westa MJ and Wentb MJ. Detection of drugs of abuse by Raman spectroscopy. *Drug Test. Analysis* 2011; 3: 532-538.
6. Zhang Y, Hong H, Cai W. Imaging with Raman Spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010; 11: 654-661.
7. Ferraro JR, Nakamoto K, Brown CW. *Introductory Raman Spectroscopy*, (2nd ed), Elsevier, 2003; pp 95-146.
8. Smekal A. *Zurquantentheorie der dispersion*. *Naturwiss* 1923; 11: 873-875.
9. Raman CV and Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature* 1928; 121: 501-502.
10. Smith E, & Dent G. *Modern Raman spectroscopy - A practical approach*. England: John Wiley&Sons Ltd. 2005: pp 225.
11. Xie W, Qiu P, and Mao C. Bio-imaging, detection and analysis by using nanostructures as SERS substrates. *J Mater Chem*. 2011; 21: 5190-5202.
12. Lam T. A New Era in Affordable Raman Spectroscopy. *Raman Technology For Today's Spectroscopists*, 2004: 30-37.
13. Ochsenskühn MA and Campbell CJ. *Biomedical SERS Studies Using Nanoshells* Challa SSR Kumar (ed.), *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012: pp 658.
14. Fleischmann M, Hendraa PJ, McQuillana AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett* 1974; 26: 163.
15. Schlücker S. Surface-enhanced Raman spectroscopy: Concept and chemical applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53: 4756-4795.
16. Yang J, Li JB, Gong QH, et al. High aspect ratio SiNW arrays with Ag nano particles decoration for strong SERS detection. *Nanotechnology* 2014; 25: 465-707.
17. Maier SA. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer. Berlin:2007.ss.224.
18. Wilson AJ, Willets KA. Surface-enhanced Raman scattering imaging using noble metal nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2013; 5: 180-189.
19. Chan CY, Li J, Ong HC, et al. Angle-Resolved Surface-Enhanced Raman Scattering. Challa S. S. R. Kumar (ed.), *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*

- racterization, Springer- Berlin: 2012: pp 658.
20. Moskovits M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: A brief retrospective. *Journal of Raman Spectroscopy* 2005; 36: 485-496.
 21. McFarland AD, Haynes CL, Mirkin CA, et al. Color My Nanoworld, *J Chem Educ* 2004; 81: 544.
 22. Stiles, PL, Dieringer JA, Shah NC, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu Rev Anal Chem* 2008; 1: 601-626.
 23. Kneipp K, Kneipp H, Kneipp J. Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates from single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. *Acc Chem Res* 2006;39: 443-450.
 24. Grasselli JG, Bulkin BJ. *Analytical Raman Spectroscopy*; Chemical Analysis, vol. 114; John Wiley&Sons: New York, 1991.
 25. McLaughlin G, Doty KC, Lednev IK. Discrimination of human and animal blood traces via Raman spectroscopy. *Forensic Science International* 2014; 238: 91-95.
 26. Kwiatkowski A, Czerwicka M, Smulko J, et al. Detection of denatonium benzoate (Bitrex) remnants in noncommercial alcoholic beverages by Raman spectroscopy. *J Forensic Sci*, 2014;59: 1358-1363.
 27. Ali EMA, Edwards HGM, Scowen IJ. Rapid in situ detection of street samples of drugs of abuse on textile substrates using micro Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A* 2011; 80: 2-7.
 28. Ali EMA, Edwards HGM, Scowen IJ. In-situ detection of single particles of explosive on clothing with confocal Raman microscopy. *Talanta* 2009; 78: 1201-1203.
 29. Massonnet G, Buzzini P, Monard F, et al. Raman spectroscopy and micro spectrophotometry of reactive dyes on cotton fibres: Analysis and detection limits. *Forensic Science International* 2012; 222: 200-207.
 30. Heudt L, Debois D, Zimmerman TA, et al. Raman spectroscopy and laser desorption mass spectrometry for minimal destructive forensic analysis of black and color inkjet printed documents. *Forensic Science International* 2012; 219: 64-75.
 31. Sikirzhyskaya A, Sikirzhyski V, Lednev IK. Raman spectroscopic signature of vaginal fluid and its potential application in forensic body fluid identification. *Forensic Science International* 2012; 216: 44-48.
 32. Olds WJ, Jaatinen E, Fredericks P, Cletus B, Panayiotou H, Izake EL. Spatially offset Raman spectroscopy (SORS) for the analysis and detection of packaged pharmaceuticals and concealed drugs. *Forensic Science International* 2011; 212: 69-77.
 33. Elshout M1, Erckens RJ, Webers CA, et al. Schouten detection of Raman spectra in ocular drugs for potential *In-vivo* application of Raman spectroscopy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2011;27: 445-451.
 34. Liu Y, Chao K, Nou X, et al. Feasibility of colloidal silver SERS for rapid bacterial screening. *Sens. & Instrumen. Food Qual* 2009; 3: 100-107
 35. Lahr RH, Vikesland PJ. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) cellular imaging of intracellularly biosynthesized gold nanoparticles. *ACS Sustainable Chem Eng* 2014; 2: 1599-1608.
 36. Cui L, Chen S, Zhang K. Effect of toxicity of Ag nano particles on SERS spectral variance of bacteria. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014; 22: 1061-1066.
 37. Hobro AJ1, Konishi A, Coban C, et al. Raman spectroscopic analysis of malaria disease progression via blood and plasma samples. *Analyst* 2013; 138: 3927-3933.
 38. Duarte J, Pacheco MT, Machado RZ, et al. Use of near-infrared raman spectroscopy to detect IgG and IgM antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum samples of domestic cats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002; 48: 585-589.
 39. Rusciano G, Capriglione P, Pesce G, et al. Raman microspectroscopy analysis in the treatment of *acanthamoeba keratitis*. 2013;20, 8: e72127.
 40. Gonchukov S, Sukhinina A, Bakhmutov D, et al. Raman spectroscopy of saliva as a perspective method for periodontitis diagnostics. *Laser Phys. Lett.* 2012; 9: 73-77.
 41. Wang W, Zhao J, Short M, et al. Real-time in vivo cancer diagnosis using raman spectroscopy. *J Biophotonics.* 2014; 12: 9999.
 42. Fox SA, Shanblatt AA, Beckman H, et al. Raman spectroscopy differentiates squamous cell carcinoma (SCC) from normal skin following treatment with a high-powered CO₂ laser. *Lasers Surg. Med.* 2014; 46: 757-772.
 43. Cao G, Hajisalem G, Li W, et al. Quantification of an exogenous cancer biomarker in urinalysis by Raman Spectroscopy *Analyst* 2014; 139: 5375-5378.
 44. Li S, Li L, Zeng Q, et al. Characterization and non-invasive diagnosis of bladder cancer with serum surface enhanced Raman spectroscopy and genetic algorithms. *SciRep* 2015; 7: 9582.